

報告番号	※ 甲 第 11030 号
------	---------------

主 論 文 の 要 旨

論文題目 Development and Application of Image-based Cell Morphological Analysis for Non-destructive Cell Quality Control (非破壊的な細胞品質評価に向けた細胞画像情報解析手法の構築とその応用に関する研究)

氏 名 佐々木 寛人

論 文 内 容 の 要 旨

再生医療技術とは、疾患や事故などで組織が欠損した臓器を再構築し、機能を回復させる新しい医療技術である。特に、自己増殖能と分化多能性を有する幹細胞を用い、細胞を角膜、肝臓、心筋、軟骨などの組織に分化誘導し移植を行う幹細胞治療の試みが、既に世界各国で実施されている。将来、再生医療が広く実用化される段階に至れば、ドナー不足によって移植困難であった患者の治療や、現存する医療では治療が難しいアルツハイマー病やパーキンソン病といった難病疾患の治療を実現することができると期待されており、少子高齢化社会を迎える我が国の医療の切り札として、現在盛んに研究が進められている。

分化誘導法の確立や分化多能性に関するメカニズム解明などの基盤研究が著しく発展を遂げている一方で、再生医療技術は未だ医療現場で広く活用される段階には至っていない。その原因の一つとして、治療用ヒト細胞の品質を保証するための細胞品質評価技術の不足が挙げられる。再生医療に向けて、患者から採取したヒト細胞を体外で培養し、治療に必要な細胞数を確保することは必要不可欠な操作である。しかし、ヒト培養細胞は患者間の個人差、培養手技、培地成分、継代数など複数の要因が複雑に影響し、その品質が大きく変化してしまうことが問題となっている。そのため、細胞そのものを医療材料として用いる再生医療において、ヒト培養細胞の品質評価は医療効果と安全性の担保のために非常に重要な課題である。細胞品質評価技術は、フローサイトメトリーや定量PCRなど現在でも数多く存在し、細胞生物学研究において広く活用されている。しかし、そのほとんどが破壊的な評価手法であり、医療用細胞、特に培養中のヒト細胞の品質評価には適用することができない。そのため、再生医療の実用化に向けて、細胞にダメージを与えない非破壊的な品質評価手法の開発が強く望まれている。

位相差顕微鏡を用いた細胞形態診断は非破壊的に培養細胞を評価する手段として広く活用されており、培養熟練者による顕微鏡撮像に基づく培養細胞の経験的診断は、培養工程を制御する上で貴重な情報源である。そこで本論文では、培養熟練者の経験的診断を工学

技術として昇華することで細胞の品質評価が実現可能なのではないか、という考えに基づき、位相差顕微鏡画像を用いた非破壊的な細胞画像情報解析手法の構築を考案した。一般的な画像解析手法では、細胞の輪郭情報を画像から抽出するための染色操作が必須であり、非染色な位相差顕微鏡画像を用いた細胞画像解析技術の実施例は非常に稀である。そのため、まずは位相差顕微鏡画像を用いた細胞形態情報の抽出に向けた画像処理技術の基礎設計や多変量解析による培養熟練者による経験的診断のモデル化を目指し、研究を遂行した。さらに、様々な培養条件を設定しデータを蓄積することによって、本技術の汎用性と実用可能性の検証を実施した。

本論文では、再生医療技術および細胞の画像解析技術に関する現状を取りまとめた序章に続き、第2章から第5章の合計4章にわたって、細胞画像情報解析技術の基盤技術の構築から、培養工程・培養環境・幹細胞品質・細胞の多様性という、再生医療に向けたヒト細胞の培養工程において重要な評価対象と考えられる4つの項目について焦点を当て、実用例を示しながら本技術の有効性を紹介する。

第2章では、「細胞画像情報解析による培養工程の評価」を行った。本章では、細胞画像情報解析の基盤技術として、(A) 画像解析に向けた細胞画像処理技術、(B) 出力された細胞形態情報の解析手法、さらには (C) 多変量解析による培養工程評価という3種類の技術の確立を目指した。具体的には、ヒト線維芽細胞 (NHDF)、ヒト表皮角化細胞 (NHEK) など再生医療分野で用いられているヒト正常細胞を培養し、培養中連続的に取得した位相差顕微鏡画像から抽出した細胞形態情報を元に、(1) 細胞増殖予測モデル、(2) 異種細胞混在モデル、(3) 培養手技におけるエラー検出モデルの構築を検討した。本章の結果より、細胞形態情報を用いることで、細胞増殖度など培養中の細胞の状態を数値的に比較することが可能となり、種々の細胞培養工程を評価することが可能となった。本章は、経験的に運用されている細胞培養手技および培養工程を定量的に比較し、それらを画一化するための評価手法としての本技術の有効性を示したといえる。

第3章では、「細胞画像情報解析による培養環境の評価」を行った。本章では、培養環境、特に細胞培養用の培地成分の違いを検出するための細胞形態解析技術の確立を目指した。前章で検証した培養工程の評価と比べ、細胞培養用の培地成分などのわずかな違いは細胞形態の違いとして抽出できる情報は限定されてしまう。また、培地成分の最適化は組み合わせや添加物の含有量など膨大な組み合わせを検討しなければならず、細胞を用いた細胞培養培地の評価の際には、省コスト化が課題となっている。本章では、マイクロデバイスを用いた画像情報の安定化と分布情報を活用した細胞集団同士の数量的比較によって、画像解析技術の小スケール化と培養環境が影響する細胞形態情報の比較検証を実施した。本章の結果は、マイクロデバイスを用いた細胞画像情報解析プラットフォームの小スケール化を実現し、また細胞の集団の分布情報を活用することによって、細胞培養用培地の組成までも識別することが可能であることを明らかにした。本結果は、細胞の表現型によって化合物や添加物の効果を評価する Cell-based assay においても、細胞画像情報解析を活用することができることを示したといえる。

第4章では、「細胞画像情報解析による幹細胞品質の評価」を行った。本章では、骨髓由来間葉系幹細胞 (hBMSCs) をモデル細胞とし、細胞画像情報解析による幹細胞品質評価の妥当性を検証した。具体的には、3種類の hBMSCs を増殖が停止するまで約1年間に渡って継代培養し、各継代において細胞の増殖能・分化能を測定した。そして、それらの特性を分化誘導前の細胞形態情報のみから数値的に予測できるかどうか検証を行った。また、同時に継代培養途中の細胞の遺伝子発現解析を行い、培養工程における幹細胞の劣化を分析するとともに、「細胞形態を評価することは、どのような生物現象を評価していることにつながるのか」という本技術の生物学的裏付けとなるデータとして検証を行った。本章の結果より、連続的に取得した位相差顕微鏡画像から得られる細胞形態情報によって、幹細胞の分化能（骨分化、脂肪分化、軟骨分化）、さらに増殖能を高精度に予測できることが可能であることが示された。また、細胞骨格関連の遺伝子群と細胞老化に関わる遺伝子群の連動した発現量変動が継代培養途中の遺伝子発現解析より確認でき、細胞形態によって細胞の劣化を検出することの生物学的な妥当性が示唆された。本章で示す幹細胞品質を早期に予測できる技術は、今後移植用の患者由来のヒト初代培養細胞の品質評価にも活用できるものであると考えられる。

第5章では、「細胞画像情報解析による細胞の多様性評価」を行った。本章では、対象とする細胞種および分野を拡張させることを目指し、細胞画像情報解析によって細胞の多様性を評価した。細胞種、培養環境など合計100条件を超える多様な培養条件において取得した細胞画像を用い、様々な細胞画像に適用可能な汎用性の高い細胞画像処理手法 (CellFIE: cell fingerprint-based identification and evaluation) を開発した。本章の結果より、煩雑で膨大な処理工程が必要であった位相差細胞画像の解析を高速化かつ安定化させることを可能にした。さらに、細胞画像を検索することで、培養中の細胞の状態や品質を評価することができる基盤技術を構築した。本技術を活用することで、セルバンクや研究施設において培養細胞の品質評価が実現できる可能性が示唆された。

本論文で構築した細胞画像情報解析技術は、非破壊的にヒト培養細胞の品質を評価することができる、全く新しい技術として期待される。また、このような新しい技術は、ヒト培養細胞を活用した医療技術に新たな可能性を開き、再生医療実用化に向けた細胞培養技術の標準化と細胞品質評価技術の構築、という点において、学術上または工業上も大きく貢献し得るものであると考えている。